DOI:10.11931/guihaia.gxzw202312013

烟草野火病叶际微生物群落结构与多样性

郭涛[1,2]，汪汉成[2]，余知和[1*]，蔡刘体[2]，王丰[2*]，陈兴江[2]
（1. 长江大学 生命科学学院，湖北 荆州 434025；2. 贵州省烟草科学研究院，贵阳 550081）

摘要：叶际微生物种群稳定与烟株健康密切相关。为揭示感染野火病烟株叶际微生态特征，该文采用 Illumina 高通量测序技术对不同发病程度烟株叶片的病斑与健康组织进行微生物群落结构与多样性分析。结果显示：（1）病斑组织与健康组织优势菌为变形菌门（Proteobacteria）和子囊菌门（Ascomycota），且在病斑组织的相对丰度显著高于健康组织；优势属为假单胞菌属（*Pseudomonas*）、泛菌属（*Pantoea*）、链格孢属（*Alternaria*）、小不整球壳属（*Plectosphaerella*）和锥盖伞属（*Conocybe*），仅假单胞菌属在病斑组织的相对丰度显著高于健康组织。（2）病斑组织细菌群落多样性和丰富度高于健康组织，并随病害程度的增加，多样性指数呈先减后增、丰富度指数呈先增后减趋势；病斑组织真菌群落丰富度和多样性指数随病害程度的增加先增后减，轻度和中度病叶病斑组织真菌群落多样性和丰富度高于健康组织，但重病组织真菌群落多样性和丰富度低于健康组织。（3）病斑和健康组织细菌的基因功能信息及相对丰度基本类似，主要为代谢、遗传信息处理和环境信息处理 3 类；真菌的优势功能类群为植物病原菌、动物病原菌-内生真菌-植物病原菌-木质腐生真菌、未定义腐生真菌、木质腐生真菌和植物病原菌-木质腐生真菌。该结果为认识烟草野火病演变规律及叶际微生物群落特征提供了科学依据。

关键词：烟草野火病，高通量测序，病叶，群落结构，多样性指数，丰富度指数

中图分类号：文献标识码：文章编号：

Microbial community structure and diversity of leaf phyllosphere in tobacco plants infected with wildfire disease

GUO Tao[1,2]，WANG Hancheng[2]，YU Zhihe[1*]，CAI Liuti[2]，
WANG Feng[2*]，CHEN Xingjiang[2]
(1. *College of Life Sciences*, *Yangtze University*, Jingzhou 434025, Hubei, China; 2. *Guizhou Academy of Tobacco Sciences*, Guiyang 550081, Guizhou, China)

Abstract： The stability of phyllosphere microbial community is closely related to plant health. In order to understand the microecological characteristics of tobacco leaves infected with wildfire disease, community structure and diversity of phyllosphere microbiome in diseased spots and healthy tissues of tobacco leaves with different degrees of disease using high-throughput sequencing technology in this paper. The results showed that the dominant microorganisms in diseased and

---

基金项目：中国烟草总公司科技项目（110202101048（LS-08），110202001035(LS-04)）；国家自然科学基金（32160522，31960550）；贵州省科技基金（黔科合基础-ZK[2021]重点 036）；贵州省“百层次”创新型人才（黔科合平台人才-GCC[2022]028-1、黔科合平台人才-GCC[2023]108）；贵州省科技创新人才团队项目（黔科合平台人才-CXTD[2023]021）；贵州省应用技术研究与开发资金后补助项目；中国烟草总公司贵州省公司科技项目（2024XM06）。

第一作者：郭涛(1998-)，硕士研究生，研究方向为生物学，（E-mail）2634150274@qq.com。
***通信作者：**余知和，博士，教授，从事真菌生物学及植物病害研究，（E-mail）zhiheyu@hotmail.com.；王丰，博士，研究员，主要从事烟草栽培与微生物学研究，（E-mail）584228992@qq.com.。

healthy tissues were Proteobacteria and Ascomycota, and their relative abundance in diseased tissues was significantly higher than that in healthy tissues. The dominant genera were *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Alternaria*, *Plectosphaerella* and *Conocybe*, and only the relative abundance of *Pseudomonas* in diseased tissues was significantly higher than that in healthy tissues. The diversity and richness of bacterial communities in diseased spots were higher than those in healthy tissues, and the diversity index showed a trend of decreasing and then increasing with the increase of the degree of disease, and the richness index showed a trend of increasing and then decreasing. The richness and diversity index of fungal communities in diseased spots showed a trend of increasing and then decreasing with the increase of the disease degree, and the diversity and richness of fungal communities in diseased spots of mildly and moderately diseased leaves were higher than that in healthy tissues, but the diversity and richness of fungal communities in heavily diseased tissues were lower than those in healthy tissues. Gene functional information and relative abundance of bacteria in diseased spots and healthy tissues are generally similar, primarily related to metabolism, genetic information processing and environmental information processing. The dominant functional taxa of fungi were plant pathogen, animal pathogen-endophyte-plant pathogen-wood saprotroph, undefined saprotroph, wood saprotroph and plant pathogen-wood saprotroph. The results provide a reference for the understanding of evolutionary pattern of tobacco wildfire disease and characterization of the phyllosphere microbial community.
Key words: tobacco wildfire disease, high-throughput sequencing, diseased leaf, community structure, diversity index, richness index

烟草是我国重要的经济作物，在山地现代农业发展实践中具有重大作用。近年来，由丁香假单胞菌烟草致病变种（*Pseudomonas syringae* pv. tabaci）引起的野火病（tobacco wildfire）已演变成烟草种植的主要细菌性叶斑类病害，常与角斑病、赤星病、棒孢霉叶斑病等混合发生，给烟叶生产造成严重的经济损失（张广民等，2002；陈焘等，2018）。

植物病害发生在很大程度上与植物微生态环境失衡密不可分，叶际微生物是叶际微生态环境中的重要组成成分。研究表明，叶际微生物群落结构的稳定程度与植物叶片健康息息相关（Lindow & Brandl., 2003; Shakir et al., 2021）。随着高通量测序技术的发展与成熟，越来越多的学者应用该技术研究植物病害与微生物群落间的关系（Li et al., 2022）。烟草作为以收获叶片为主的重要经济作物，其真菌性叶部病害发生与叶际微生物群落间的关系研究已有诸多报道。如黄宇等（2020）对烟草白粉病研究表明，健康烟叶叶际真菌群落丰富度及多样性高于病叶，病健烟叶叶际优势真菌均为高氏白粉菌属（*Golovinomyces*）、曲霉属（*Aspergillus*）和链格孢属（*Alternaria*），且感病组织的丰度高于健康组织。而烟草赤星病叶际微生物群落以子囊菌门和变形菌门为主，链格孢属和假单胞菌属分别为真菌和细菌的优势属，但健康烟叶真菌和细菌群落多样性及丰富度高于病叶（刘亭亭等，2021；Dai et al., 2022）。Sun 等（2023）报道了感染靶斑病的烟株叶片病原菌的丰度随病级增加而显著上升，叶际真菌群落多样性和丰富度均低于健康烟叶，细菌群落多样性高于健叶、丰富度低于健叶。由此可见，由真菌引起的烟草叶部病害其叶际微生物群落的变化与发病程度存在密切关联。

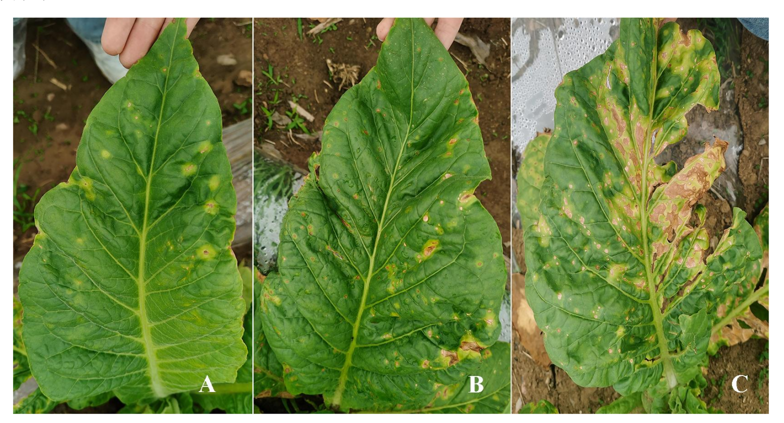
烟草野火病是一种细菌性病害，20 世纪 40 年代末期在我国云南烟区零星发生。随着烟草栽培面积逐渐扩大，野火病常与其他烟草叶部病害混合发生，病害流行年份造成重大损失。目前针对烟草野火病发生的影响因素研究主要集中于气候、温湿度等环境因子，对于叶际微生物的群落结构及多样性尚缺乏深入的认知。程浅（2020）探讨了烟草叶际细菌群落结构与野火病发生的关系，但缺少真菌群落结构的相关研究。Si 等（2023）研究了野火病对雪茄烟的影响，表征感染叶片与健康叶片之间的微生物群和化学因子差异，但未对不同病害程度的野火病烟叶做出进一步分析。烟草野火病不仅在田间为害烟叶，而且在烟叶采收后至烘干前仍可继续为害，导致叶片病斑继续扩大变成枯焦状而失去烘烤价值。因此，其病害流行程度与叶际微生物群落的动态变化亟需研究阐明。为此，本研究以不同发病程度的烟草野火病烟叶为研究对象，采用高通量测序技术探讨：（1）不同程度发病烟叶病斑组织与健康组织中微生物群落结构与多样性差异；（2）不同发病程度病斑组织微生物群落的变化；（3）不同发病程度烟叶组织微生物的功

能变化；旨在为认识烟草野火病的演变规律提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2019 年 6 月，在种植品种为云烟 87 的贵州省施秉县烟叶产区（107°51′36"—108°28′51" E，26°49′47"—27°21′15" N）采集移栽 60 d 后发生烟草野火病的烟叶样品，根据病斑面积占比分为轻度（5%~10%）、中度（11%~20%）和重度（21%~50%）叶片（如图 1 所示），依次记为 A、B、C。用无菌剪刀剪取样品叶片的病斑组织(b)和健康组织(j)，分别混合均匀置于 50 mL 无菌离心管中，每个样品 3 管，每管 5 g。样品采集后放入低温保存箱，并迅速带回实验室，放置于 -80℃冰箱保存、备用。



A. 轻度；**B.** 中度；**C.** 重度。
A. Mild; **B**. Moderate; **C.** Heavy.

图 1 罹病烟叶症状
Fig. 1 Symptoms of diseased tobacco leaves

1.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增及高通量测序

参照 Fast DNA® SPIN 试剂盒（MP Biomedicals）使用说明，提取叶际微生物基因组总 DNA，经超微量分光光度计 NanoDrop 2000（Thermo Fisher Scientific）检测质量与浓度后，用无菌水将 DNA 稀释至 1 ng·μL^{-1} 备用。

细菌 16S rRNA 基因和真菌转录间隔区 ITS1 区分别采用引物 515F/806R（Yuan et al., 2020）和 ITS5-1737F/ITS2-2043R（Wu et al., 2019）进行扩增。PCR 扩增体系及程序参照 Apprill 等（2005）。扩增产物经 2%浓度琼脂糖凝胶电泳检测、GeneJET 胶回收产物纯化试剂盒（Thermo Fisher Scientific）纯化后送至北京诺禾致源科技股份有限公司，利用 Ion Plus Fragment Library 试剂盒（Thermo Fisher Scientific）构建文库并在 Ion S5TMXL 平台上进行测序。

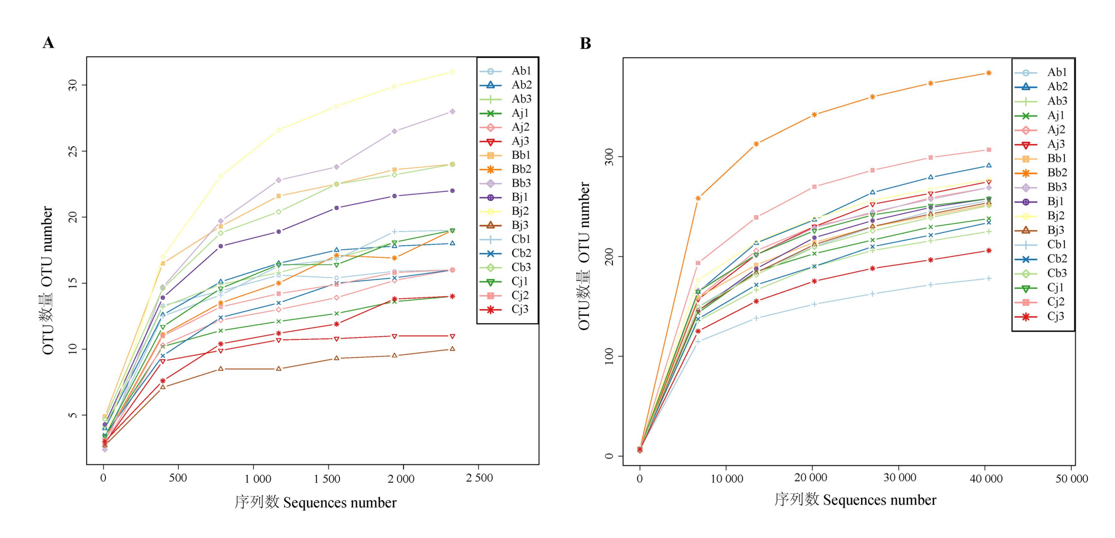
1.3 数据质控及群落结构与多样性分析

下机数据经 Cutadapt（https://cutadapt.readthedocs.io/en/v1.9.1/）软件剔除、过滤低质量序列，以及 UCHIME 算法去除嵌合体序列，最终得到有效序列（Clean reads）。使用 UPARSE（http://www.drive5.com/usearch/）软件在相似度≥97%的条件下对 clean reads 进行 OTU(Operational taxonomic units)聚类，筛选每个 OTU 的代表性序列，并基于 Mothur 算法将 OTU 代表性序列与 Unite（7.2）数据库和 Silva132 数据库比对、注释物种分类（Edgar & Robert., 2013; Urmas et al., 2013）。利用 R 语言工具绘制物种群落柱状图、主成分分析（principal component analysis, PCA）图和 Venn 分析图等。利用 QIIME（https://docs.qiime2.org）按样本最小序列数进行样本序列抽平后，计算样品微生物群落 Alpha 多样性指数（Shannon、Simpson、Chao1 等）；使用 DPS 软件（http://www.dpsw.cn/download.html）进行不同组别物种相对丰度的差异性分析。采用 Tax4Fun 程序语言及 FUNGuild 和 KEGG 数据库分析真菌、细菌群落的功能类群（孙美丽等，2023）。

2 结果与分析

2.1 测序深度评估及数据质控

稀释曲线结果显示，叶际细菌的 OTU 数在测序数据量为 2 300 时曲线趋于平坦（图 2：A），叶际真菌的 OTU 数在测序数据量为 40 000 时曲线趋于平坦（图 2：B），表明测序数据已包含所测样品中绝大多数的物种信息，测序结果合理。



A. 细菌；**B.** 真菌。下同。

A. Bacteria; **B**. Fungi. The same below.

图 2 物种稀释性曲线

Fig. 2 Species rarefaction curves

原始测序数据质控后，平均每组样品的细菌和真菌分别获得 80 092 条和 70 147 高质量序列（表 1）。细菌与真菌原始测序数据的 GenBank Accession Number 分别为 PRJNA1025832、PRJNA1025370。

表 1 样本测序数据及其质控

Table 1 Sample sequencing dataand itsquality control

样本 Sample		原始序 Raw reads	高质量数据 Clean reads	序列碱基数 Base	序列平均长度 Average length（bp）	质量值 Q20（%）	GC 含量 GC（%）	利用率 Effective（%）
细菌 Bacteria	Ab	83 359	80 054	32 126 180	401	78.12	55.19	96.05
	Aj	81 920	80 147	32 116 929	400	77.29	55.57	97.83
	Bb	82 652	80 071	32 731 291	408	72.65	54.99	96.88
	Bj	81 654	80 079	32 559 142	406	70.24	55.49	98.07
	Cb	83 833	80 106	32 528 325	406	69.94	54.71	95.64
	Cj	81 902	80 096	32 246 736	402	77.69	55.56	97.79
真菌 Fungi	Ab	74 998	74 697	20 947 741	280	77.86	57.71	99.60
	Aj	57 883	57 698	17 025 787	295	76.90	59.28	99.68
	Bb	79 268	77 455	19 019 860	246	77.37	52.51	97.82
	Bj	68 573	68 346	19 933 811	292	76.76	59.16	99.68
	Cb	81 101	80 085	18 928 691	236	79.87	52.31	98.76
	Cj	62 886	62 601	17 935 754	284	74.93	58.16	99.53

2.2 叶际细菌与真菌群落结构

2.2.1 门水平叶际群落结构

健康与病斑组织的细菌群落包括变形菌门（Proteobacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）和拟杆菌门（Bacteroidetes），其中变形菌门的相对丰度病斑组织高于健康组织（图 3：A）。轻度、中度和重度病叶病斑组织优势细菌门为变形菌门（49.44%、72.39%和 61.92%），其次为厚壁菌门（0.01%、1.54%和 0.73%）和拟杆菌门（0.06%、0.19%和 0.06%）。健康组织优势细菌为变形菌门（Aj、Bj 和 Cj 相对丰度分别为 2.89%、8.76%和 3.15%）。轻度病叶的病斑与健康组织变形菌门相对丰度无显著性差异，而中度和重度病叶的病斑组织变形菌门相对丰度显著高于健康组织；厚壁菌门和拟杆菌门在 6 组样品间无显著性差异（表 2）。

健康与病斑组织的真菌群落主要为子囊菌门（Ascomycota）和担子菌门（Basidiomycota）（图 3：B），其相对丰度病斑组织高于健康组织，其中重度病叶病斑组织与健康组织间子囊菌门相对丰度存在显著性差异。轻度、中度和重度病叶病斑组织子囊菌门相对丰度分别为 10.25%、25.86%和 32.22%，担子菌门相对丰度分别为 4.52%、2.48%和 4.35%。健康组织子囊菌门相对丰度随病害程度的增加而减少（Aj、Bj 和 Cj 相对丰度分别为 6.31%、5.14%和 0.47%），担子菌门相对丰度随病害程度的增加而增加（0.19%、0.30%和 0.47%）。

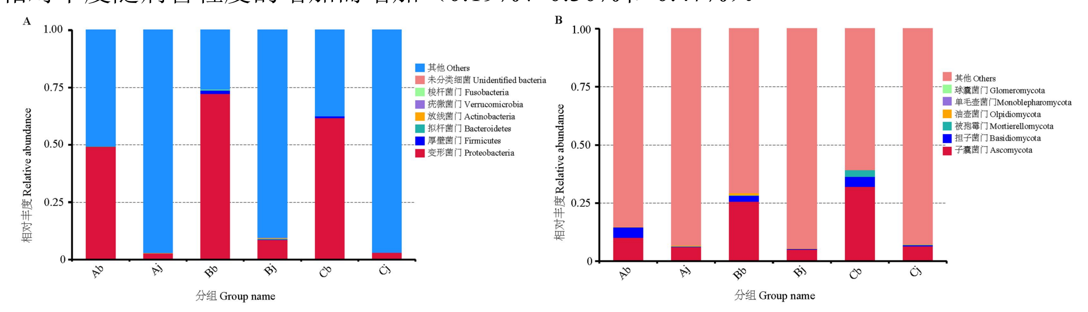


图 3 门水平群落组成
Fig. 3 Communities composition of phylum level

表 2 优势群落门水平相对丰度及差异分析
Table 2 Relative abundance and differential analysis of dominant community at phylumlevel

	类群/Taxa	Ab	Aj	Bb	Bj	Cb	Cj
细菌 Bacteria	变形菌门 Proteobacteria	0.494 4±0.306 5abc	0.028 9±0.009 9c	0.723 9±0.057 7a	0.087 7±0.107 3bc	0.619 2±0.347 3ab	0.031 5±0.012 8c
	厚壁菌门 Firmicutes	0.000 1±0.000 2a	0±0a	0.015 4±0.023 8a	0.001 1±0.001a	0.007 3±0.010 8a	0.000 3±0.000 5a
	拟杆菌门 Bacteroidetes	0.000 6±0.000 2a	0.000 4±0.000 4a	0.001 9±0.003 2a	0.003 6±0.006 2a	0.000 6±0.000 7a	0±0a
	放线菌门 Actinobacteria	0.000 1±0.000 2a	0.000 3±0.000 2a	0.001 1±0.000 9a	0.002 7±0.004 3a	0.000 1±0.000 2a	0.000 3±0.000 2a
真菌 Fungi	子囊菌门 Ascomycota	0.102 5±0.067 2ab	0.063 1±0.001 4b	0.258 6±0.187 6ab	0.051 4±0.018 4b	0.322 2±0.036 4a	0.066 7±0.043 4b
	担子菌门 Basidiomycota	0.045 2±0.069 6a	0.001 9±0.000 3a	0.024 8±0.020 4a	0.003±0.002 1a	0.043 5±0.022a	0.004 7±0.002 4a
	被孢菌门 Mortierellomycota	0.000 3±0.000 1a	0.000 5±0.000 3a	0.001 9±0.002 5a	0.000 2±0.000 1a	0.027 9±0.044 6a	0.000 4±0.000 3a
	油壶菌门 Olpidiomycota	0.001 4±0.000 3a	0.003 9±0.000 6a	0.009 3±0.014 9a	0.002 3±0.000 7a	0.000 4±0.000 2a	0.002 1±0.001 7a

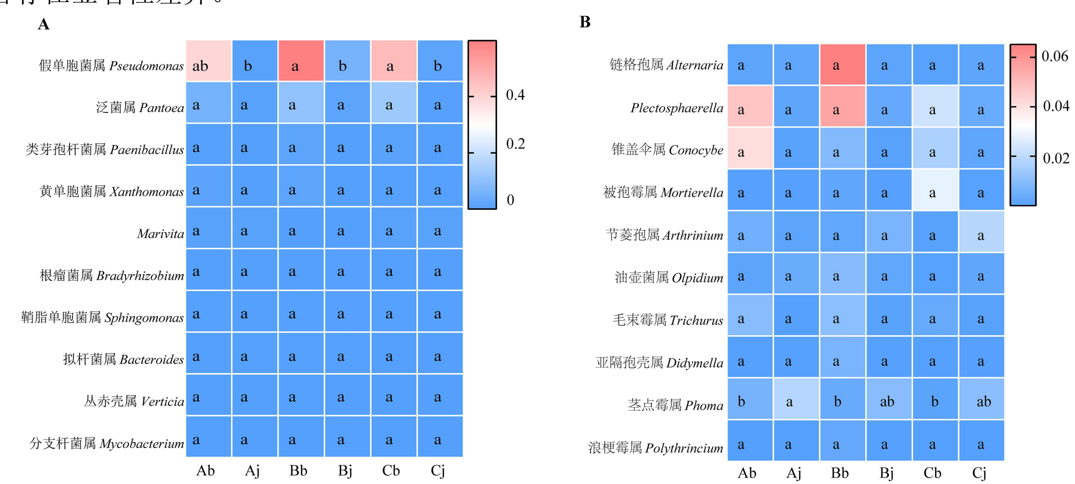
注：表格中同行方向上不同的小写字母代表存在显著性差异(P＜0.05)。
Note: Different lowercase letters in the direction of the peers in the table represent significant differences (P<0.05).

2.2.2 属水平叶际群落结构

如图 4：A 所示，健康与病斑组织的细菌群落在属水平上为假单胞菌属（*Pseudomonas*）和

泛菌属（*Pantoea*）。病斑组织 Ab、Bb 和 Cb 假单胞菌属的相对丰度（分别为 39.47%、59.83% 和 46.05%）与健康组织 Aj、Bj 和 Cj 假单胞菌属的相对丰度（分别为 0.57%、5.95%和 1.10%）存在显著差异。病斑组织泛菌属的相对丰度随病害程度增加而逐级上升，与健康组织无显著性差异。

烟叶健康与病斑组织的真菌群落优势属包括链格孢属（*Alternaria*）、小不整球壳属（*Plectosphaerella*）和锥盖伞属（*Conocybe*），其相对丰度病斑组织高于健康组织但无显著性差异（图 4：B），但茎点霉属（*Phoma*）在健康组织的相对丰度高于病斑组织，且在轻度病叶中二者存在显著性差异。



同行不同小写字母表示物种相对丰度在不同组别中存在显著性差异（P<0.05）。
Different lowercase letters in the same row indicate that the relative abundance of dominant genus is significantly different in different groups (P<0.05).

图 4 属水平群落组成热图
Fig. 4 Heatmap of the community composition at genus level

2.2.3 OTU 属水平叶际群落结构

花瓣图表明，病斑与健康组织样品共有的细菌与真菌 OTU 数目分别为 9 和 190，其中共有的细菌 OTU 分别属于假单胞菌属、泛菌属、立克次氏体目 Rickettsiales 等，共有的真菌 OTU 分别属于链格孢属、锥盖伞属、小不整球壳属、茎点霉属等。病叶 Bb 和健叶 Bj 样品细菌群落独有的 OTU 数目较其他烟叶样品高（图 5：A）；病叶 Bb 样品真菌群落独有的 OTU 数目较其他烟叶组织高（图 5：B）。

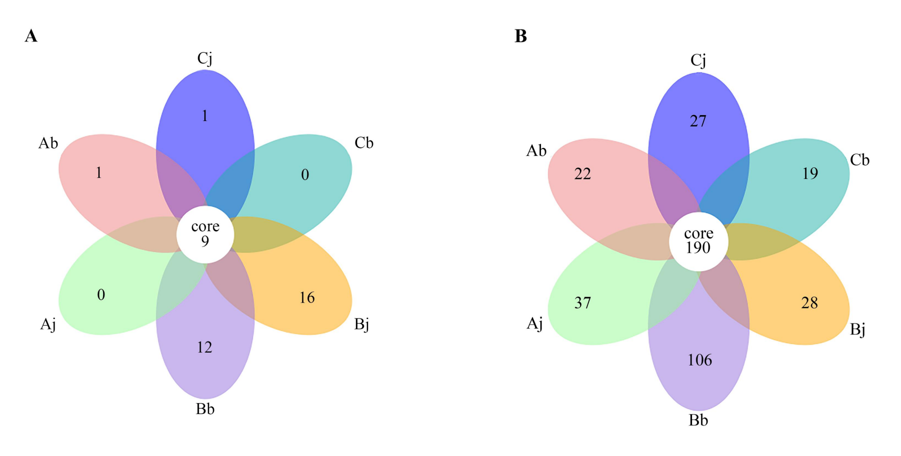


图 5 不同样本共性及特性 OTU 分析
Fig. 5 Commonality and characterization of different sample OTUs

2.3 叶际微生物群落 Alpha 多样性

如表 3，烟叶健康与病斑组织的覆盖度指数均大于 0.997，表明测序结果包含绝大多数微生物群落。供试 6 组样品细菌群落的辛普森指数、ACE 指数和覆盖度指数均无显著性差异，仅轻度病斑组织的香农指数与健康组织存在显著性差异，中度病斑组织的 Chao1 指数显著高于轻度和重度病叶健康组织。病斑组织细菌群落物种多样性与丰富度高于健康组织，香农指数和辛普森指数随烟叶病害程度的增加呈先减后增的变化趋势，而 Chao1 指数和 ACE 指数则呈现先增后减的趋势；健康组织细菌群落多样性和丰富度指数随病害程度的增加呈先增后减的趋势。

轻度和中度病斑组织真菌群落多样性和丰富度均高于健康组织，但重度病斑组织真菌群落多样性和丰富度低于其健康组织。Bb 样品的香农指数与辛普森指数显著高于 Cb、Aj、Bj 样品；6 组样品组织真菌群落的 Chao1 指数、ACE 指数和覆盖度指数均不存在显著性差异。病斑组织真菌群落多样性和丰富度指数随病害程度的增加呈先增后减的趋势；健康组织的香农指数和辛普森指数随病害程度的增加而增加，Chao1 指数和 ACE 指数则随发病程度的增加而降低。

表 3 叶际微生物群落 Alpha 多样性指数
Table 3 Alpha diversity index of phyllosphere microbial community

分组 Group		多样性指数 Diversity index		丰富度指数 Richness index		覆盖度指数 Coverage index
		香农指数 Shannon index	辛普森指数 Simpson index	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	样品覆盖度 Sample coverage
细菌 Bacteria	Ab	2.23±0.04a	0.69±0.05a	22.67±9.87ab	23.33±10.32a	0.999±0.002a
	Aj	1.65±0.05b	0.57±0.01a	15.92±4.56b	19.68±9.42a	0.999±0.001a
	Bb	1.95±0.62ab	0.58±0.17a	30.83±5.62a	31.52±5.99a	0.997±0.001a
	Bj	1.81±0.37ab	0.60±0.09a	22.04±11.20ab	24.58±11.30a	0.998±0.001a
	Cb	2.01±0.30ab	0.65±0.06a	21.61±5.26ab	23.40±5.53a	0.998±0.001a
	Cj	1.67±0.10ab	0.58±0.02a	17.32±2.53b	20.02±3.28a	0.998±0.001a
真菌 Fungi	Ab	4.47±0.18ab	0.90±0.01ab	306.01±45.82a	310.95±43.29a	0.998±0.001a
	Aj	4.16±0.21b	0.87±0.03b	302.43±25.71a	298.68±21.56a	0.999±0.000a
	Bb	5.01±0.36a	0.93±0.01a	339.90±62.17a	343.77±60.31a	0.999±0.000a
	Bj	4.22±0.42b	0.87±0.04b	286.71±11.33a	297.38±10.81a	0.999±0.000a
	Cb	4.11±0.17b	0.88±0.01b	280.40±59.85a	282.63±62.10a	0.998±0.001a
	Cj	4.53±0.44ab	0.90±0.03ab	286.81±43.37a	291.01±42.40a	0.999±0.000a

注：真菌和细菌样品同列不同字母代表差异性显著(P<0.05)。
Note: Different letters in the same column for fungal and bacterial samples represent significant differences (P< 0.05).

2.4 叶际真菌与细菌群落功能预测

基于 KEGG 数据库对叶际细菌群落 PICRUSt 功能预测结果表明，在第一级功能层水平上，健康与病斑组织叶际细菌的主要功能为代谢（metabolism）、遗传信息处理（genetic information processing）、环境信息处理（environmental information processing）、细胞转化（cellular processes）、人类疾病（human diseases）以及有机系统（organismal systems）6 类生物代谢通路（图 6：A）。健康与病斑组织叶际细菌基因功能大体相同且相对丰度无显著性差异。

基于 FUNGuild 功能预测，健康与病斑组织叶际真菌生态功能类群相似。健康与病斑组织叶际真菌优势类群包括植物病原菌、动物病原菌-内生真菌-植物病原菌-木质腐生真菌、未定义腐生真菌、木质腐生真菌和植物病原菌-木质腐生真菌。病斑组织的植物病原菌类群相对丰度高于健康组织，中度病叶病斑组织 Bb 相对丰度最高（6.23%），其次为 Ab（5.27%）、Cb（2.50%），而健康组织中 Bj 组丰度最高（0.91%）。动物病原菌-内生真菌-植物病原菌-木质腐生真菌类群的

相对丰度在病斑组织 Bb（6.51%）远高于其他病斑和健康组织。病斑组织的未定义腐生真菌、木质腐生真菌类群相对丰度均高于健康组织，前者在病斑组织 Cb 中（4.66%）丰度最高，后者在 Bb 组（1.04%）丰度最高；健康组织的植物病原菌-木质腐生真菌类群相对丰度高于病斑组织，健康组织 Aj 中（1.84%）丰度最高（图 6：B）。

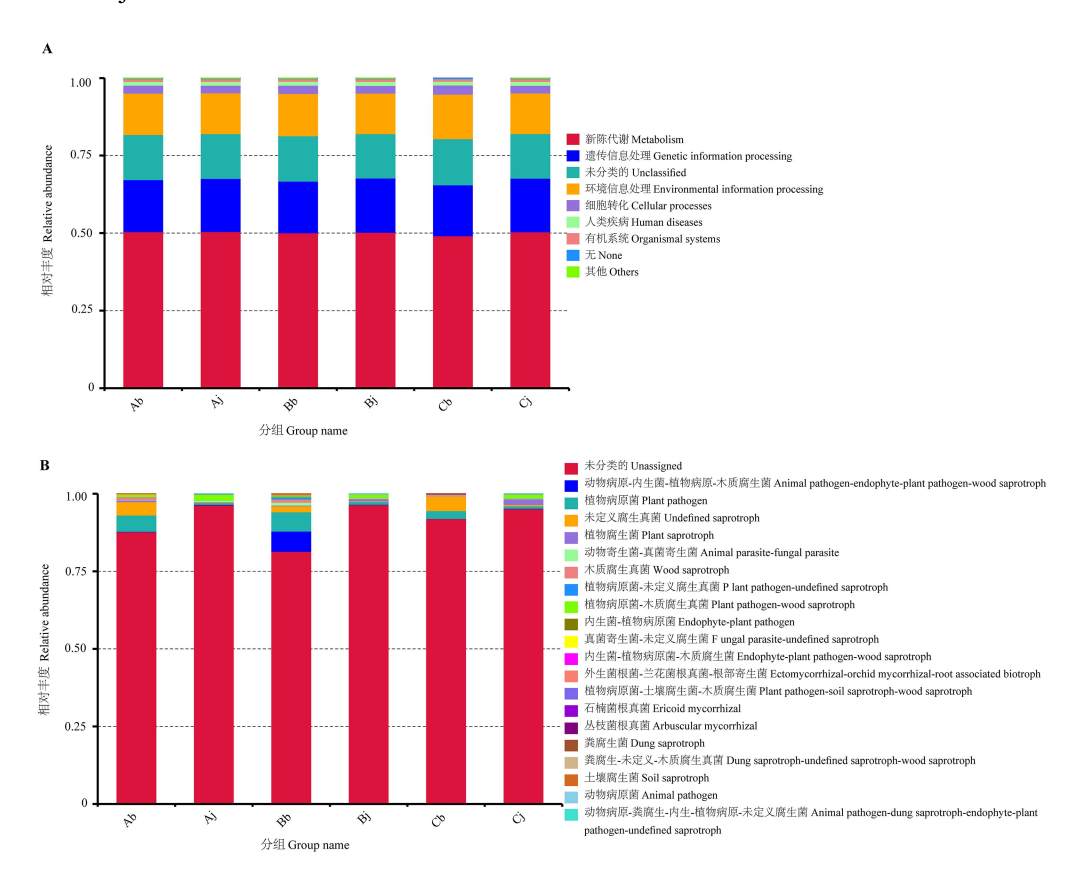


图 6 功能预测
Fig. 6 Functional prediction

3 结论与讨论

丰富多样的叶际微生物与宿主植物的健康生长密切相关。叶际微生物能够帮助宿主植物固氮、促进其生长、增强其抗逆和抗病能力，但其存在的病原微生物也可通过侵染叶片组织并在叶际定殖积累导致植物发病（Abdelfattah et al., 2015；杨宽等，2021）。本研究基于高通量测序技术，从微观层面解析了感染野火病烟叶健康与病斑组织叶际微生物的异同，并揭示了不同发病程度叶片叶际微生物群落结构与多样性。

本研究发现，感野火病烟叶的健康与病斑组织叶际微生物菌群结构在物种相对丰度上存在较大差异。病斑与健康组织叶际细菌优势门和属分别为变形菌门和假单胞菌属及泛菌属等，皆为烟草叶际常见菌群，该结果与 Qin 等（2019）对烟草野火病田间防治、孙美丽等（2023）对靶斑病烟叶叶际优势细菌和刘畅等（2020）对赤星病烟叶叶际优势细菌等研究报道一致。烟草野火病作为细菌性病害，常与真菌性病害协同发生，烟田中野火病与靶斑病、赤星病等复合侵染造成烟株发病的案例屡见不鲜，因此其优势细菌类群或存在相似之处。假单胞菌属作为野火病的病原，其相对丰度在病斑组织显著高于健康组织，表明病原菌的大量定殖是导致野火病蔓延发生的主要原因。泛菌属虽然在病斑和健康组织中的相对丰度无显著性差异，但其丰度随病害程度的增加而逐级上升，说明泛菌属与烟草野火病的发生存在正相关关系，可能在病害发生中具有潜在促进作用。叶际真菌主要分布于链格孢属、小不整球壳属和锥盖伞属等，这与刘亭亭等（2022）、向立刚等（2020）研究结果类似。链格孢属真菌的存在，表明了烟叶后期存在赤

星病与野火病混合发生的可能，这从目前烟田病害发生规律上可见一斑。此外，链格孢属、小不整球壳属和锥盖伞属在病斑组织的富集丰度明显高于健康组织，这表明三者在病害发生时或与病原菌存在协同促进的作用，有助于病害发生。值得注意的是，茎点霉属在健康组织的相对丰度高于病斑组织，且在轻度病叶中二者存在显著性差异，表明其在病害抑制中具有潜在作用。针对叶际微生物中变化显著的优势菌群值得进一步功能探索与研究。

微生物之间高度复杂的关系使得局部某些病原菌或有益菌的丰度变化直至引起整个群落组成的改变，而植物病害发生伴随着病原菌的入侵定殖，常常会改变微生物环境和群落结构，对微生物群落多样性产生影响（刘宇星等，2022）。Zhang 等（2018）发现南瓜白粉病病原菌 *Podosphaere* 的丰度随病情加重而增加；Sun 等（2023）对不同病害等级烟草靶斑病烟叶的研究表明，叶际病原菌的丰度随着烟叶病级的增加而显著上升；陈乾丽等（2019）对不同霉变程度烟叶霉烂病的研究结果发现，病原菌 *Aspergillus* 在霉变重的烟叶叶片中的相对丰度较霉变轻的烟叶更高。以上研究表明，病原菌丰度及群落特征常与烟叶发病程度存在一定关联。本文选取的 3 类不同发病程度的野火病烟叶进行微生物群落结构分析，发现假单胞菌属的相对丰度在轻度、中度和重度发病烟叶均大于 39%，但在中度发病烟叶的丰度最高，这与以上研究结果和预测有所不同。此外，烟叶健康与病斑组织的微生物多样性指数随着病害程度的增加呈先增后减或逐级递减。造成这种现象可能的原因是在野火病发病初期，由于叶片组织完整性被破坏，引起环境中包括病原菌在内的各类微生物涌入遭破坏的组织中大量定植，进而造成病斑组织微生物群落多样性和丰富度短暂增加，但随着病斑面积扩大，叶片有限的营养物质和生存空间不断降低，微生物间的定殖和竞争加剧，最终导致病原菌以及其它微生物数量降低。Huang 等（2021）对不同病级的亚隔孢壳属叶斑病烟叶的研究也有类似发现，发病烟叶组织虽然在功能预测中显示植物病原菌相对丰度随病害增加而成比例上升，但叶际病原菌 *Didymella* 的相对丰度在病害后期反而有下降趋势。这恰与本研究假单胞菌属的丰度在重度病斑组织中表现出降低趋势有异曲同工之处。叶际微生物群的结构变化因受到环境等因素的影响往往难以准确预测，但其趋势大体可循。一般来讲，病原菌和与其相关联的微生物菌群大量定植于叶片组织造成的叶际微生态平衡被破坏是导致烟叶病害发生的微观机制之一，由此可知，烟草病害的防治可围绕抑制破坏病原菌和相关菌群的定植进而达到生物防控的目的。刘天波等（2021）利用拮抗菌防治烟草野火病得到较好效果，并发现假单胞菌属、泛菌属等烟草叶际微生物所占比例发生显著变化，芽孢杆菌属作为有益菌相比对照增加 3.9 倍。

叶际微生物在定植积累过程中常发挥自身特定的生理功能，与其群落结构及组成息息相关（高爽等，2016）。本研究中功能预测发现健康与病斑组织的细菌类群基因功能信息及相对丰度较为趋同，以代谢、遗传信息处理和环境信息处理 3 种功能为主，该结果与烟草角斑病、靶斑病的叶际细菌功能预测结果较为一致（吴小军等，2023；孙美丽等，2023），其原因可能是野火病菌在以上叶际病害中也常被作为优势类群，因而功能预测存在相似之处。本研究发现病斑组织细菌多样性与丰富度高于健康组织，推测野火病侵染烟叶后，假单胞菌属、泛菌属等菌群在叶际养分的利用上占据主要地位，在定植过程中获取营养物质大量繁殖，其代谢、遗传和环境信息处理等功能被进一步刺激开发，进而演变为感病烟叶叶际优势细菌属。此外，本研究还发现病斑与健康组织叶际真菌群落功能预测中，病原菌、内生菌及腐生菌等占据主导地位，病斑组织的植物病原菌类群相对丰度高于健康组织，这与 Huang 等（2021）报道一致，进一步说明了植物病原菌和内生菌、腐生菌为烟草叶际优势真菌类群，植物病原菌是导致叶际病害的重要原因。

参考文献：

ABDELFATTAH A, DESTRI NMG, CACCIOLA SO, et al., 2015. Metabarcoding analysis of fungal diversity in the phyllosphere and carposphere of olive (*Olea europaea*) [J]. PLoS ONE, 10(7):

e0131069.
APPRILL A, MCNALLY S, PARSONS R, et al., 2005. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton [J]. Aquat Microb Ecol, 75(2): 129-137.
CHEN QL, LI Z, WANG HC, et al., 2019. Fungal composition and diversity of tobacco phyllosphere from cured tobacco leaves [J]. Acta Microbiol Sin, 59(12): 2401-2409. [陈乾丽，李忠，汪汉成，等, 2019. 烤后不同霉变程度烟叶际真菌群落组成与多样性分析[J]. 微生物学报, 59(12): 2401-2409.]
CHENG Q, 2020. Study on the relationship between the diversity of tobacco bacterial community and the occurrence of tobacco wildfire and its regulation effect. Chongqing: Southwest University: 23-24. [程浅, 2020. 烟草叶际细菌群落多样性与烟草野火病发生的关系及调控效应研究[D]. 重庆:西南大学: 23-24.]
CHEN T, ZHOU W, LI HG, et al., 2018. Research progress in disease occurrence and integrated control of tobacco wild fire [J]. Genomics Appl Biol, 37(1): 469-476. [陈焘，周玮，李宏光，等, 2018. 烟草野火病的发生及综合防治研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 37(1): 469-476.]
DAI YF, WU XM, WANG HC, et al., 2022. Spatio-temporal variation in the phyllospheric microbial biodiversity of *Alternaria alternata*-infected tobacco foliage [J]. Front Microbiol, 13: 920109-920109.
EDGAR H, ROBERT C, 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nat Methods, 10(10): 996-998.
GAO S, LIU XC, DONG Z, et al., 2016. Advance of phyllosphere microorganisms and their interaction with the outside environment [J]. Plant Sci J, 34(4): 654-661. [高爽，刘笑尘，董铮，等, 2016. 叶际微生物及其与外界互作的研究进展[J]. 植物科学学报, 34(4): 654-661.]
HUANG Y, WANG H C, CAI L T, et al., 2021. Phyllospheric microbial composition and diversity of the tobacco leaves infected by *Didymella* segeticola [J]. Front Microbiol, 12: 699699.
HUANG Y, WANG HC, CHEN QL, et al., 2020. Community structure and diversity of fungi in leaves of tobacco plant infected with powdery mildew [J]. Guizhou Agric Sci, 48(5): 54-58. [黄宇，汪汉成，陈乾丽，等, 2020. 感染白粉病烟株叶片真菌的群落结构与多样性[J]. 贵州农业科学, 48(5): 54-58.]
LINDOW SE, BRANDL MT, 2003. Microbiology of the phyllosphere [J]. Appl Environ Microbiol, 69(4): 1875-1883.
LI PD, Zhu ZR, Zhang Y, et al., 2022. The phyllosphere microbiome shifts toward combating melanose pathogen [J]. Microbiome, 10(1):56-56.
LIU C, WANG HC, XIE HL, et al., 2020. Biodiversity analysis of phyllosphere bacterial genus from tobacco leaves infected by brown spot disease [J]. Tob Sci Technol, 53(2): 8-14. [刘畅，汪汉成，谢红炼，等, 2020. 感染赤星病烟草叶际细菌的多样性分析[J]. 烟草科技, 53(2): 8-14.]
LIU TB, TENG K, ZHOU XP, et al., 2021. Effects of antagonistic bacteria on tobacco wild fire and responses of phyllosphere microbiota [J]. Microbiol Chin, 48(8): 2643-2652. [刘天波，滕凯，周向平，等, 2021. 拮抗菌群对烟草野火病的防治效果及叶际微生物群落多样性的影响[J]. 微生物学通报, 48(8): 2643-2652.]
LIU TT, ZENG YT, WANG HC, et al., 2021. Metabolic and microbial community structure analysis in the phyllosphere of tobacco leaves with different maturity during brown spot occurring season [J]. Chin Tob Sci, 42(6): 22-29. [刘亭亭，曾陨涛，汪汉成，等, 2021. 赤星病发生期不同成熟度烟叶叶际微生物代谢与群落结构[J]. 中国烟草科学, 42(6): 22-29.]

LIU TT, WANG HC, SUN ML, et al., 2022. Effects of Bordeaux mixture on the community structure and metabolic function of tobacco phyllosphere microorganisms [J]. Chin J Pestic Sci, 24(6): 1446-1455. [刘亭亭, 汪汉成, 孙美丽, 等, 2022. 波尔多液对烟草叶际微生物群落结构与代谢功能的影响[J]. 农药学学报, 24(6): 1446-1455.]

LIU YX, DONG CB, SHAO QY, et al., 2022. Advances on phyllosphere microorganisms and their association with plant health [J]. J Microbiol, 42(2): 88-98. [刘宇星, 董醇波, 邵秋雨, 等, 2022. 叶际微生物与植物健康研究进展[J]. 微生物学杂志, 42(2): 88-98.]

QIN C, TAO JM, LIU TB, et al., 2019. Responses of phyllosphere microbiota and plant health to application of two different biocontrol agents [J]. AMB Express, 9(1): 42.

SHAKIR S, ZAIDI SS, VRIES DTF, et al., 2021. Plant genetic networks shaping phyllosphere microbial community [J]. Trends in Genetics, 37(4): 306-316.

SI H, CUI B, LIU F, et al. Microbial community and chemical composition of cigar tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves altered by tobacco wildfire disease[J]. Plant Direct, 2023, 7(12): e551-e551.

SUN ML, SHI CH, HUANG Y, et al., 2023. Effect of disease severity on the structure and diversity of the phyllosphere microbial community in tobacco [J]. Front Microbiol, 13(4): 1081576-1081576.

SUN ML, SHI CH, XIAO BQ, et al., 2023. Composition and diversity of phyllospheric microbial community in tobacco leaves infected by tobacco target spot disease [J]. Tob Sci Technol, 56(4): 1-9. [孙美丽, 史彩华, 肖本青, 等, 2023. 烟草靶斑病叶际微生物群落结构与多样性分析[J]. 烟草科技, 56(4): 1-9.]

URMAS K, NILSSON RH, KESSY A, et al., 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi [J]. Mol Ecol, 22(21): 5271-5277.

WU XJ, WANG HC, SUN ML, et al., 2023. Composition and diversity of phyllosphere microbial community on tobacco leaves infected with angular leaf spot [J]. Tob Sci Technol, 56(10): 1-10. [吴小军, 汪汉成, 孙美丽, 等, 2023. 烟草角斑病叶际微生物群落结构与多样性分析[J]. 烟草科技, 56(10): 1-10.]

WU YY, GENG JK, XU S, et al., 2019. Isolation and identification of intestinal fungi in *Spodopterafrugiperda* larvae of Chongqing area [J]. J Southwest Univ (Nat Sci Ed), 41(9): 1-8.

XIANG L G, WANG H C, ZHENG P, et al., 2020. Analysis of endophytic fungi and phyllosphere fungi of flue cured tobacco leaves with brown spot disease [J]. Acta Tab Sin, 26(4): 93-100. [向立刚, 汪汉成, 郑苹, 等, 2020. 赤星病烤后烟叶内生及叶际真菌分析[J]. 中国烟草学报, 26(4): 93-100.]

YANG K, WANG HL, YE KH, et al., 2021. Advances in research on phyllosphere microorganisms and their interaction with plants [J]. J Yunnan Agric Univ (Nat Sci), 36(1): 155-164. [杨宽, 王慧玲, 叶坤浩, 等, 2021. 叶际微生物及与植物互作的研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 36(1): 155-164.]

YUAN Z, ZHANG CY, PENG XX, et al., 2020. Intestinal microbiota characteristics of mice treated with *Folium senna* decoction gavage combined with restraint and tail pinch stress [J]. 3 Biotech, 10(4): 1-11.

ZHANG GM, LU JH, KAN GF, et al., 2002. Recent development in the study of tobacco wildfire disease [J]. Acta Tabac Sin, 8(2): 34-37. [张广民, 吕军鸿, 阚光锋, 等, 2002. 烟草野火病研究概况[J]. 中国烟草学报, 8(2): 34-37.]

ZHANG Z, LUO LY, TAN XQ, et al., 2018. Pumpkin powdery mildew disease severity influences the fungal diversity of the phyllosphere [J]. Peer J, 6(2): e4559.